

**UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR,
SEMIPOLAR, DAN NONPOLAR HERBA KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.)
C. Presl.) TERHADAP SEL MCF-7**



Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Fakultas Farmasi

Oleh:

ATIKAH HAPSARI

K 100 130 175

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2016**

HALAMAN PERSETUJUAN

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR, DAN NONPOLAR HERBA KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) TERHADAP SEL MCF-7

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

ATIKAH HAPSARI

K 100 130 175

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



Dr. Haryoto, M.Sc.

NIP. 196206061988031001

HALAMAN PENGESAHAN

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR, DAN NONPOLAR HERBA KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) TERHADAP SEL MCF-7

OLEH

ATIKAH HAPSARI

K 100 130 175

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Selasa, 20 Desember 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dewan Penguji:

1. Azis Saifudin, Ph.D., Apt.
(Ketua Dewan Penguji)
2. Wahyu Utami, Ph.D., Apt.
(Anggota I Dewan Penguji)
3. Dr. Haryoto, M.Sc.
(Anggota II Dewan Penguji)

(.....)
(.....)
(.....)

Dekan,



Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 6 Januari 2016

Penulis



ATIKAH HAPSARI

K 100 130 175

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK ETANOL, FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR, DAN NONPOLAR HERBA KITOLOD (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) TERHADAP SEL MCF-7

Abstrak

Kanker payudara merupakan kanker yang umum terjadi dan menempati urutan pertama penyebab kematian pada wanita di dunia. Kebanyakan obat antikanker bersifat tidak selektif, sehingga mengganggu pertumbuhan dari sel normal. Hal tersebut mendorong para peneliti untuk mengeksplorasi agen kemopreventif yang berasal dari bahan alam, seperti tanaman kitolod. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar herba kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl.) pada sel MCF-7. Herba kitolod dikeringkan, diserbuk, dan diayak dengan mesh nomor 40, kemudian dimaserasi dengan etanol 96% selama 72 jam. Skrining fitokimia dilakukan dengan penambahan beberapa pereaksi dan ditegaskan dengan uji KLT yang menggunakan fase diam silika GF₂₅₄, fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3) lalu divisualisasi pada UV 254nm, 366nm, dan sinar tampak. Digunakan pereaksi semprot anisaldehyd-H₂SO₄, dragendroff, sitoborat, dan FeCl₃ sebagai penampak bercak hasil KLT. Fraksinasi menggunakan metode KCV, kemudian dilakukan uji sitotoksik dengan MTT assay. Hasil yang diperoleh yaitu ekstrak etanol herba kitolod positif mengandung flavonoid, fenolik, alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, dan tanin. Nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar berturut-turut yaitu 521,054; 213,294; 499,947; dan 239,431 µg/mL. Penelitian ini menunjukkan bahwa semua sampel yang diuji memiliki aktivitas sitotoksik moderat pada sel MCF-7.

Kata Kunci: Sitotoksik, Kitolod, Fraksi, MTT assay, Sel MCF-7.

Abstract

Breast cancer is a major cancer suffered and the most cause of death by women in the world. The existing drugs of anticancer are not selective, disturbing the growth of normal cells. It encourages researchers to explore a chemopreventive agent from the nature materials. This study was conducted to determine the cytotoxic activity of ethanol extract, polar fractions, semipolar, and nonpolar herb kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) Presl.) on MCF-7 cells. First, herb kitolod was dried, refined, and sieved using mesh number 40 and then macerated using 96% ethanol for 72 hours. Phytochemical screening was conducted with TLC using GF₂₅₄ silica as stationary phase, n-hexane: ethyl acetate (7: 3) as mobile phase, then the result was visualized on UV 254nm, 366nm, and visible light. Anisaldehyd, dragendroff, sitoborat, and FeCl₃ reagents spray were used as visualizer of TLC spot results. Fractination using KCV method, then cytotoxic test using MTT assay. A result obtained, the ethanol extract of herb kitolod positively contains flavonoids, phenolics, alkaloids, terpenoids, saponins, steroids and tannins. IC₅₀ value of the ethanol extract, polar fractions, semipolar, and nonpolar are 521,054; 213,294; 499,947; and 239,431 µg/mL. This study showed that the ethanol extract, polar fraction, semipolar, and nonpolar of herb kitolod had moderate cytotoxic activity on MCF-7 cells.

Keywords: Cytotoxic, Kitolod, fractions, MTT assay, MCF-7 cells.

1. PENDAHULUAN

Kanker adalah sekelompok penyakit yang menyebabkan sel-sel dalam tubuh berubah dan tumbuh di luar kendali (*American Cancer Society*, 2016). Menurut World Health Organization (WHO) 2008, kanker merupakan penyebab kematian terbesar ke lima di dunia, khususnya di negara berkembang. Pada tahun 2012 jumlah kematian yang disebabkan oleh kanker mencapai 8.2 juta orang. (Kementerian Kesehatan RI, 2015). Kanker yang umumnya terjadi pada wanita selain kanker kulit yaitu kanker payudara, jumlah penderitanya di Amerika mencapai lebih dari 3,1 juta orang (*American Cancer Society*, 2015), sedangkan di dunia terdapat sekitar 522.000 wanita meninggal karena kanker payudara yang dideritanya dengan tingkat kematian yang bervariasi di seluruh dunia pada tahun 2012 (Anderson, 2014).

Pengobatan kanker pada umumnya dapat melalui jalan operasi (pembedahan), pemberian zat kimia yang bersifat sitotoksik (kemoterapi), dan melalui penyinaran (radioterapi). Pengobatan dengan cara operasi hanya bisa dilakukan untuk kanker yang belum mengalami penyebaran hingga ke pembuluh darah atau kelenjar getah bening. Terapi kanker dengan menggunakan agen sitotoksik (kemoterapi) dan penyinaran (radiasi) juga menimbulkan beberapa efek samping seperti mual, muntah, kerontokan rambut, dan bersifat tidak selektif, sehingga dapat mengganggu pertumbuhan sel normal (Kurnijasanti *et al.*, 2008). Efek samping dan kekurangan dari obat kanker yang ada tersebut mendorong para peneliti untuk mencari obat kanker yang lebih aman dan selektif yang berasal dari bahan alam, seperti kitolod.

Kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) merupakan suatu tanaman yang secara empirik biasa dimanfaatkan sebagai obat oleh masyarakat. Tanaman ini memiliki khasiat sebagai obat untuk mengatasi gangguan mata seperti katarak (Amaliah, 2014), mata minus serta mengobati kebutaan yang disebabkan karena glaukoma (Wardani & Siska, 2010), asma, sifilis (Koller, 2009), antivirus (Rothan *et al.*, 2014), dan antibakteri (Siregar, 2015). Selain itu juga memiliki aktivitas sebagai antimikroba pada bakteri *Staphylococcus hominis* (Ismailova, 2008) dan *Staphylococcus aureus* (Safitri *et al.*, 2009).

Daun kitolod memiliki kandungan senyawa alkaloid, saponin, flavonoida, dan polifenol (Hariana, 2008). Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun dan bunga kitolod positif mengandung alkaloid, saponin, flavonoida, dan tanin (Siregar, 2015). Flavonoid merupakan senyawa bahan alam yang diketahui memiliki khasiat sebagai antikanker. Senyawa turunan flavonoid menunjukkan aktivitas antitumor dan juga merupakan kandidat *multidrug resistance-reversing agent* dalam kemoterapi kanker. Flavonoid bekerja secara signifikan dengan mekanisme menghambat *p – glycoprotein* pada kemoterapi kanker, meningkatkan efikasi obat antikanker dan melawan kerja dari

MDR atau *multi-drug resistance* (Bansal *et al.*, 2009). Penelitian sebelumnya juga telah membuktikan bahwa fraksi etil asetat dari daun kitolod memiliki kemampuan *moderate* untuk menghambat sel kanker WiDr dengan nilai IC₅₀ 191,74 µg/mL (Magfiroh, 2015) dan pada ekstrak etanol herba kitolod mampu menghambat pertumbuhan sel heLa dengan nilai IC₅₀ 227 µg/mL (Hapsari *et al.*, 2016).

2. METODE

2.1. Preparasi Sampel

Sebanyak 339,08 gram herba kitolod yang telah diserbuk dan diayak dengan mesh nomor 40 dimasukkan ke dalam bejana maserasi. Sampel dimaserasi dengan pelarut 2,5 L etanol 96%, didiamkan selama 72 jam pada suhu kamar, sambil sesekali diaduk, selanjutnya disaring (maserasi dilakukan sebanyak 3 kali). Maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotary evaporatour hingga terbentuk masa kental berwarna coklat kehitaman. Kemudian dilanjutkan dengan uji kandungan senyawa.

2.2. Uji Kandungan Senyawa

Uji kandungan senyawa dilakukan dengan menggunakan KLT pereaksi semprot dan uji tabung. Uji KLT dengan menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 7:3. Senyawa yang sudah selesai dielusi, kemudian disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-H₂SO₄, dragendorff, sitoborat, dan FeCl₃ untuk menampakkan bercak dan sebagai penegasan kandungan senyawa apa saja yang terkandung di dalam ekstrak herba kitolod. Pereaksi semprot anisaldehyd-H₂SO₄ digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa terpenoid dan saponin, dragendroff untuk alkaloid, sitoborat untuk flavonoid, dan FeCl₃ untuk senyawa fenolik. Selanjutnya, ekstrak etanol kental difraksinasi dengan metode KCV.

2.3. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV). Fase diam yang digunakan yaitu silika G₆₀ dan silika GF₂₅₄ serta N-heksana:etil asetat (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; dan 5:5) dan etanol yang digunakan sebagai fase gerak masing masing dengan volume sebanyak 150 mL (Haryoto *et al.*, 2015). Ekstrak kental ditimbang sebanyak 20 g yang sudah dilarutkan dengan metanol dan dicampur dengan silika G₆₀ (30-70 *mesh*). Sample diletakkan di bagian atas kolom KCV dan dielusi dengan fase gerak, kemudian difraksinasi. Hasil dari fraksi dikumpulkan dan dielusi dengan menggunakan KLT dan dipisah berdasarkan sifat kepolarannya (polar, semipolar, dan nonpolar) dengan fase gerak n-heksan:etil asetat perbandingan 7:3. Fraksi yang bersifat polar, semipolar, dan non polar dikentalkan dengan *rotary evaporator*, kemudian dilakukan uji sitotoksik pada sel MCF-7.

2.4. Uji Aktivitas Sitotoksik

Ekstak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar sebanyak 10 mg ditimbang dan dilarutkan dalam 100 µL pelarut DMSO, kemudian ditambahkan media kultur DMEM ad 10 mL. Dibuat larutan substok dengan proses pengenceran, sehingga didapatkan konsentrasi 31,25; 62,5; 125; 250; dan 500 µg/mL. Sampel didistribusikan ke dalam masing-masing sumuran sebanyak 100 µL, berurutan dari konsentrasi rendah ke tinggi, lalu diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur yang mengandung sampel dibuang, kemudian ditambahkan 100 µL larutan MTT ke dalam masing-masing sumuran dan diinkubasi selama 2 jam pada inkubator CO₂ dengan suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal berwarna ungu. Semua proses harus dilakukan pada kondisi steril dan di dalam *Laminar Air Flow*.

Hasil absorbansinya dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 594 nm. Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai X yang berasal dari kurva baku regresi linear $Y = BX + A$ (log konsentrasi ekstrak/fraksi dalam µg/mL vs % sel hidup). Data absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung jumlah % sel hidup dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{(\text{Abs perlakuan} - \text{Abs kontrol media})}{(\text{Abs kontrol sel} - \text{Abs kontrol media})} \times 100\%$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Ekstraksi

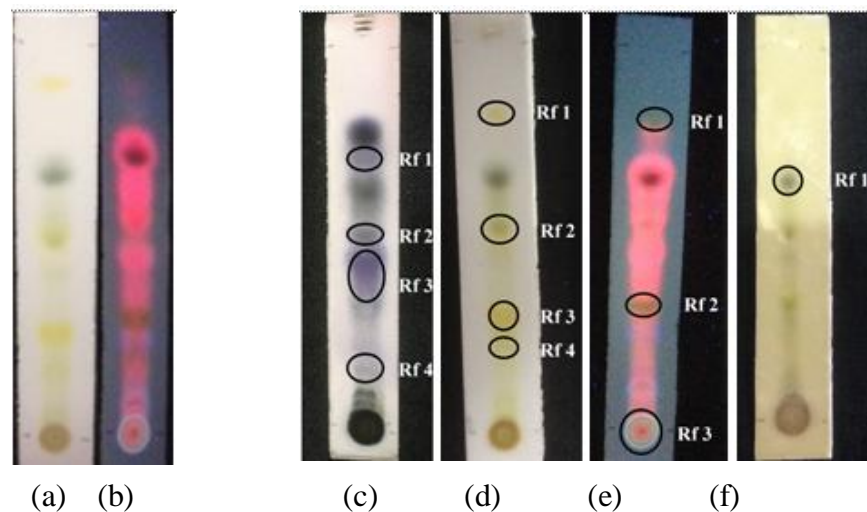
Proses ekstraksi senyawa dengan menggunakan etanol 96%, karena mampu melarutkan senyawa yang bersifat polar, seperti flavonoid (Nirwana *et al.*, 2015). Penyerbukan herba kitolod perlu dilakukan sebelum memulai proses maserasi. Tujuan dari proses penyerbukan yaitu agar material yang terendam dalam solven memiliki permukaan yang luas, sehingga solven mampu menjangkau senyawa yang terdapat di dalam sel atau ruang antar sel lebih maksimal (Saifudin, 2014). Penyerbukan herba kitolod yang sudah dikeringkan dengan sinar matahari selama 3-5 hari dilakukan dengan menggunakan blender. Hasil penyerbukan tidak boleh terlalu halus, agar tidak menyebabkan larutan menjadi keruh serta tidak terbentuk dispersi pada proses disolusi dan difusi (Saifudin, 2014).

Pada penelitian ini dilakukan pengayakan serbuk herba kitolod dengan menggunakan mesh nomor 40. Tujuan dari pengayakan yaitu agar mendapatkan serbuk yang berukuran homogen. Serbuk dengan mesh nomor 40 memiliki permukaan yang luas dan lebih banyak untuk kontak dengan solven, sehingga penyarian senyawa oleh solven juga lebih banyak. Selain itu, serbuk dengan mesh 40 dapat menghasilkan rendemen yang lebih banyak jika dibandingkan dengan mesh nomor 20

(serbuk terlalu kasar) dan sebuk utuh (Maulida and Guntarti, 2015). Proses pengentalan ekstrak diusahakan dengan menggunakan suhu serendah mungkin, direkomendasikan pada suhu kurang dari 60°C. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya degradasi senyawa yang terdapat di dalam ekstrak (Saifudin, 2014). Rendemen ekstrak etanol herba kitolod yang diperoleh dari hasil maserasi yang telah dilakukan yaitu sebanyak 10,86%.

3.2. Uji Kandungan Senyawa

KLT bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung di dalam ekstrak herba kitolod berdasarkan sifat kepolaranya (Saifudin, 2014). Pada percobaan dengan berbagai perbandingan fase gerak n-heksan:etil asetat (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, dan 5:5), didapatkan hasil pemisahan yang paling baik dan menimbulkan bercak terbanyak (tanda bulatan pada gambar) yaitu pada perbandingan 7:3. Uji kandungan senyawa dilakukan dengan KLT pereaksi semprot dan uji tabung. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu anisaldehyd- H_2SO_4 , dragendroff, sitoborat, dan FeCl_3 . Pereaksi semprot anisaldehyd- H_2SO_4 untuk mendeteksi adanya terpenoid dan saponin, dragendroff untuk mendeteksi adanya alkaloid, sitoborat untuk mendeteksi adanya flavonoid, serta untuk mendeteksi FeCl_3 adanya fenolik.



Gambar 1. Kromatogram hasil uji kandungan senyawa ekstrak herba kitolod dengan KLT pereaksi semprot. Sebelum diberi pereaksi semprot pada sinar tampak (a), sebelum diberi pereaksi semprot pada UV 366 nm (b), setelah diberi pereaksi semprot anisaldehyd- H_2SO_4 pada sinar tampak (c), setelah diberi pereaksi semprot dragendroff pada sinar tampak (d), setelah diberi pereaksi semprot sitoborat pada UV 366 nm (e), setelah diberi pereaksi semprot FeCl_3 pada sinar tampak (f)

Gambar 1 di atas merupakan hasil deteksi senyawa ekstrak etanol herba kitolod dengan menggunakan metode KLT pereaksi semprot. Pada penambahan reagen semprot anisaldehyd- H_2SO_4 muncul warna biru violet yang divisualisasi pada sinar tampak yang menunjukkan bahwa positif mengandung terpenoid dan saponin, sedangkan pada penambahan reagen semprot dragendroff

muncul warna orange kecoklatan pada sinar tampak yang menunjukkan adanya alkaloid. Pada penambahan reagen semprot sitoborat muncul warna kuning kehijauan pada sinar UV 366 nm yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid, sedangkan pada penambahan reagen semprot FeCl_3 muncul warna abu-abu biru pada sinar tampak yang menunjukkan adanya senyawa fenolik (Saifudin, 2014).

Tabel 1. Hasil uji kandungan senyawa dari ekstrak etanol herba kitolod dengan KLT pereaksi semprot

Pereaksi semprot	Rf	Penampakan bercak	Dugaan senyawa yang terkandung
Anisaldehyd- H_2SO_4 (pada sinar tampak)	0,74	Biru violet	Terpenoid dan Saponin
	0,54		
	0,44		
	0,22		
	0,96		
Dragendroff (pada sinar tampak)	0,56	Orange kecoklatan	Alkaloid
	0,32		
	0,22		
	0,78		
Sitoborat (pada sinar UV 366nm)	0,34	Kuning kehijauan	Flavonoid
	0,12		
	0,64		
FeCl_3 (pada sinar tampak)	0,64	Abu-abu biru	Fenolik

Hasil uji kandungan senyawa yang menggunakan metode KLT dengan pereaksi semprot, menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% herba kitolod positif mengandung terpenoid, saponin, alkaloid, flavonoid, dan fenolik, seperti yang ditampilkan pada Tabel 1.



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Gambar 2. Hasil dari skrining fitokimia dengan metode uji tabung positif mengandung steroid (a), positif mengandung saponin (b), positif mengandung tanin (c), positif mengandung alkaloid dengan larutan dragendroff (d), positif mengandung alkaloid dengan larutan mayer (e), positif mengandung flavonoid (f)

Tabel 2. Hasil uji kandungan senyawa dari ekstrak etanol 96% herba kitolod

Identifikasi senyawa	Pereaksi	Keterangan	Hasil
Steroid	2 mL kloroform + 10 tetes anhidrida asetat + 3 tetes H ₂ SO ₄ pekat	Terbentuk larutan berwarna merah kemudian berubah menjadi biru hijau	+
Alkaloid	Dragendroff	Terbentuk endapan jingga	+
	Mayer	Terbentuk endapan putih (<i>cloudy</i>)	+
Flavonoid	1 mL metanol + 4 tetes ammonia pekat	Terbentuk bercak kuning pada kertas saring	+
Saponin	10 mL aquades + 1 tetes HCl 2N	Terbentuk busa stabil	+
Tanin	FeCl ₃ 1%	Terbentuk warna hijau kehitaman	+

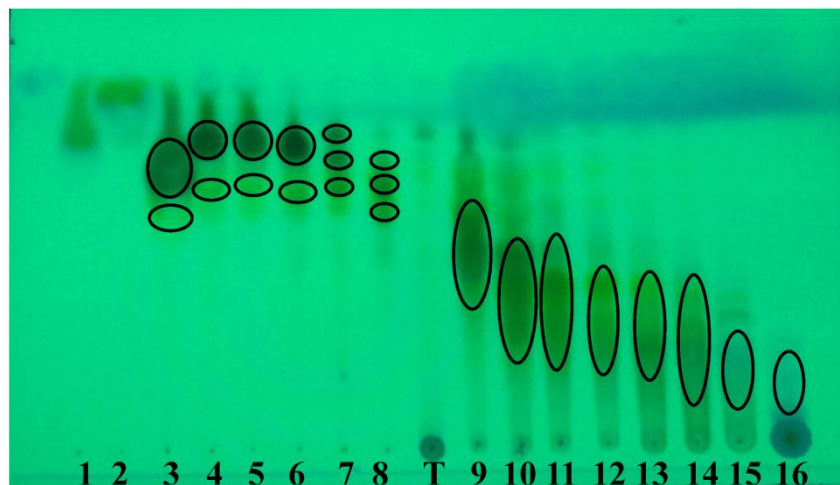
Pada hasil skrining fitokimia, ekstrak etanol 96% herba kitolod positif mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, tanin dan saponin seperti yang ditampilkan pada Gambar 2 dan Tabel 2. Timbulnya endapan akibat penambahan reagen mayer dan dragendroff merupakan kompleks dari senyawa kalium-alkaloid (Setyowati *et al.*, 2014). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry and Fay, 2004). Uji alkaloid dengan pereagen mayer menyebabkan atom nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K⁺ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap, sedangkan pada penambahan reagen dragendroff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K⁺ yang merupakan ion logam (Marliana *et al.*, 2005).

Pada uji kandungan senyawa saponin terbentuk busa stabil yang disebabkan oleh adanya gugus hidrofil dan hidrofob yang saat digojok, gugus hidrofil akan berikatan dengan air sedangkan gugus hidrofob akan berikatan dengan udara sehingga membentuk buih. Penambahan asam berguna untuk menambah kepolaran sehingga gugus hidrofil akan berikatan dan buih yang terbentuk menjadi stabil (Ismiyati *et al.*, 2015). Pada uji kandungan senyawa tanin, terbentuk warna hijau kehitaman setelah ditambahkan FeCl₃ 1%, hal tersebut dikarenakan tanin akan beraksi dengan ion Fe³⁺ membentuk senyawa kompleks (Harborne, 1987).

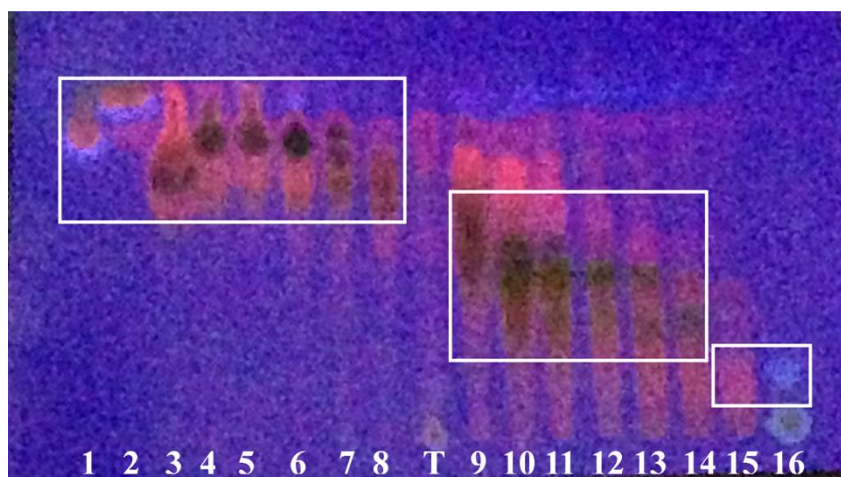
3.3. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode KCV (Kromatografi Cair Vakum). Fraksinasi merupakan usaha pemisahan yang dilakukan setelah mendapatkan fraksi aktif atau ekstrak aktif. Tujuan dari fraksinasi adalah untuk memisahkan senyawa yang berasal dari ekstrak berdasarkan sifat kepolarannya. Penjenuhan adsorben merupakan proses yang penting sebelum dilakukan fraksinasi. Tujuan dari

penjenuhan adalah untuk meningkatkan efektifitas pemisahan (Saifudin, 2014). Elusi fase gerak dengan menggunakan sistem gradien yang dimulai dari solven yang bersifat nonpolar terlebih dahulu (n-heksan:etil asetat 9:1) kemudian secara bertingkat menuju ke kombinasi solven yang bersifat polar (n-heksan:etil asetat 5:5) (Saifudin, 2014). Hasil fraksinasi ditampung dalam 16 botol yang memiliki perbandingan fase gerak yang berbeda beda, kemudian dilakukan KLT dengan fase gerak hasil optimasi, yaitu n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 7:3. Hasil dari fraksinasi digolongkan ke dalam 3 kategori, yaitu fraksi polar, semipolar, dan nonpolar. Berikut merupakan hasil kromatogram dari elusi ke-16 hasil fraksinasi pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm:



Gambar 3. Kromatogram hasil fraksinasi pada UV 254 nm



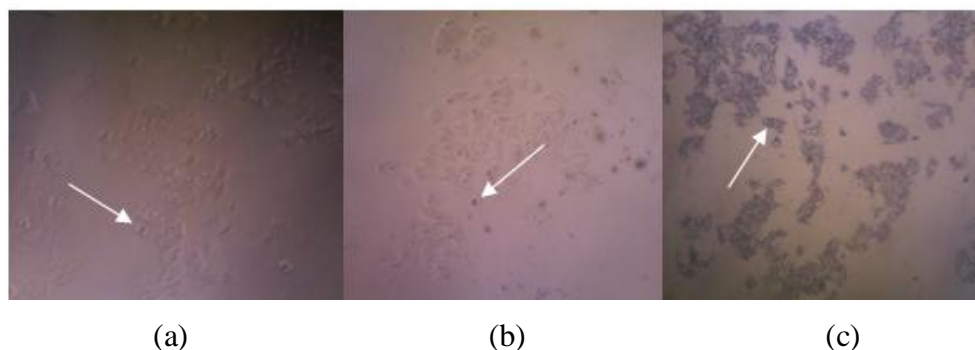
Gambar 4. Kromatogram hasil fraksinasi pada UV 366 nm

Pada Gambar 3 dan Gambar 4 terdapat 16 bercak elusi, yang dapat digolongkan menjadi 3 golongan fraksi berdasarkan sifat kepolaranya, yaitu fraksi polar, semipolar, dan nonpolar. Jika dilihat dari hasil tersebut, semakin suatu senyawa terelusi naik ke atas (bercak nomor 1-8) menandakan bahwa senyawa tersebut bersifat nonpolar.

Sedangkan pada bercak nomor 9-14, senyawa tersebut terleusi di bagian tengah plat KLT, yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat semipolar. Pada bercak nomor 15 dan 16, senyawa tersebut tertahan di bawah, tidak ikut terelusi oleh fase gerak, yang menunjukkan bahwa senyawa nomor 15 dan 16 merupakan senyawa yang bersifat polar.

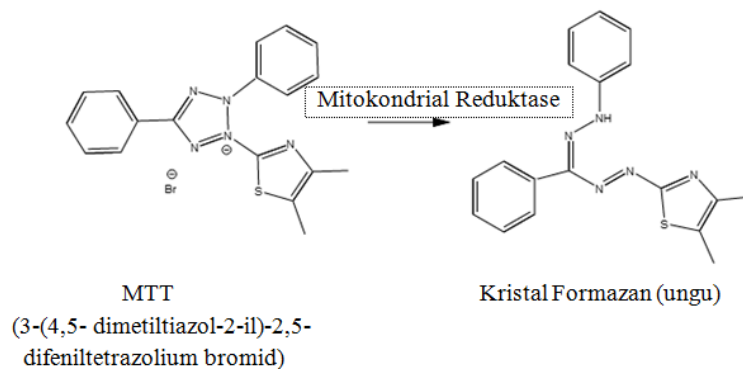
3.4. Uji Aktivitas Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan MTT *assay*. Digunakan DMSO sebagai pelarut karena merupakan solven yang mampu melarutkan senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar (BPOM RI, 2010). Pada uji sitotoksik ini, kadar DMSO yang terkandung di dalam sampel sebesar 1%. DMSO dengan kadar kurang dari 3%, tidak bersifat toksik atau membunuh pada sel kanker (Purwaningsih *et al.*, 2014), sehingga dapat digunakan sebagai kontrol pelarut. Penambahan reagen MTT berfungsi untuk mengetahui sel kanker yang masih hidup, melalui reaksi enzim reduktase yang membentuk kristal formazen berwarna ungu.



Gambar 5. Kontrol sel MCF-7 (a), Sel MCF-7 mati pada fraksi polar konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ (b), dan kristal formazen (c)

Gambar 5 menunjukkan morfologi sel MCF-7 hidup (sebelum diberi perlakuan), sesudah diberi perlakuan, dan kristal formazen yang terbentuk selama uji sitotoksik. Pada morfologi sel hidup MCF-7 berbentuk bulat tak beraturan yang dikelilingi oleh membran dengan warna jernih. Sedangkan setelah diberi perlakuan morfologi dari sel kanker berubah, inti sel menghitam dan bentuk sel mengecil. Hal tersebut menandakan bahwa sel kanker telah mati akibat pemberian perlakuan. Pembentukan kristal formazen berasal dari reaksi enzimatis antara reagen MTT dengan enzim yang terdapat pada sel hidup. Reaksi ini merubah warna sel yang masih hidup menjadi ungu, sehingga pada hasil pembacaan dengan ELISA *reader*, jika semakin banyak kristal formazen yang terbentuk, maka jumlah sel kanker yang masih hidup juga semakin banyak.

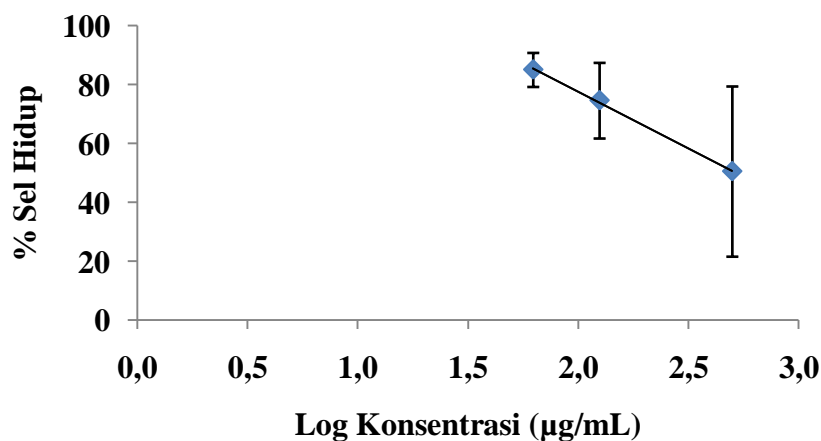


Gambar 6. Reaksi pembentukan kristal formazan (ungu) dari reagen MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)

Prinsip dari metode MTT (Gambar 6) merupakan reaksi enzimatik yang melibatkan proses reduksi garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yang berwarna kuning oleh enzim reduktase yang terdapat pada mitokondria sel kanker yang masih hidup. Reaksi tersebut akan menghasilkan kristal formazan yang berwarna ungu yang tidak dapat larut dalam air. Berhentinya reaksi enzimatik tersebut diakibatkan oleh penambahan SDS yang merupakan suatu *reagen stopper* yang bersifat detergenik. SDS akan bekerja dengan cara melarutkan kristal formazan yang kemudian dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 594nm. Warna ungu yang terbentuk, menunjukkan sel kanker yang masih hidup. Absorbansi yang diperoleh berbanding lurus dengan % sel hidup, sehingga semakin besar absorbansi maka jumlah sel kanker yang masih hidup juga semakin banyak (Putri, 2013).

Tabel 3. Data % sel hidup ekstrak etanol herba kitolod

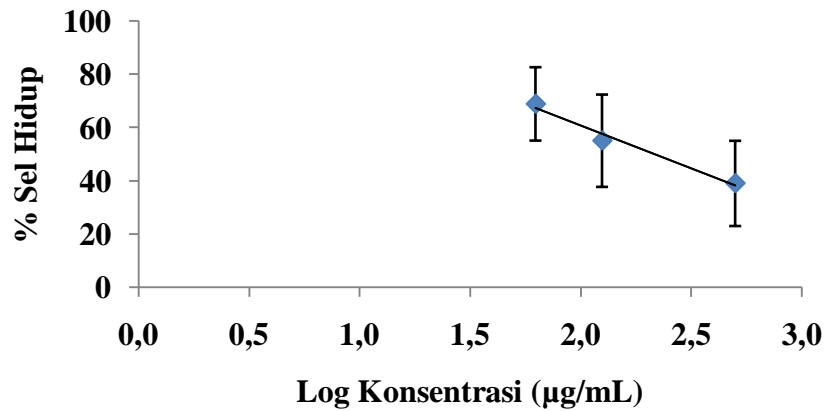
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Absorbansi 3	Absorbansi 4	Abs Rata-rata	% sel hidup rata-rata	SD (n=2)
62,5	1,796	0,267	0,258	0,262	85,000	5,786
125	2,097	0,261	0,241	0,251	74,545	12,856
500	2,699	0,247	0,202	0,225	50,455	28,927



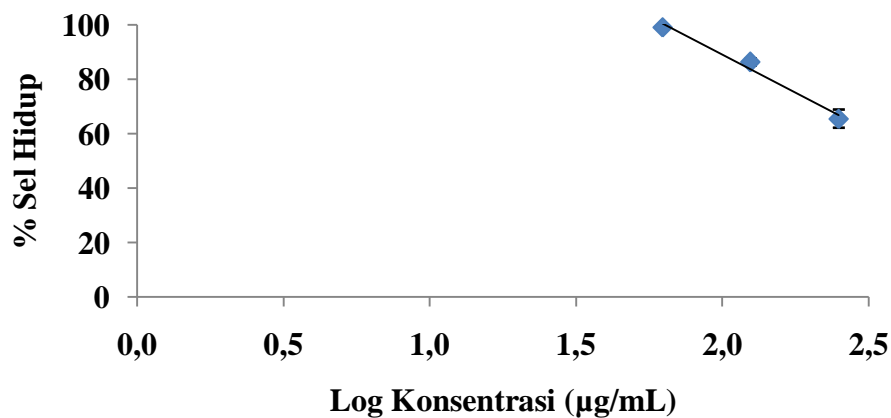
Gambar 7. Grafik log konsentrasi vs % sel hidup ekstrak etanol herba kitolod

Tabel 4. Data % sel hidup fraksi polar herba kitolod

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Abs Rata-rata	% sel hidup rata-rata	SD (n=2)
62,5	1,796	0,319	0,288	0,304	68,868	13,78646
125	2,097	0,301	0,262	0,282	55,031	17,34462
500	2,699	0,274	0,238	0,256	38,994	16,0096

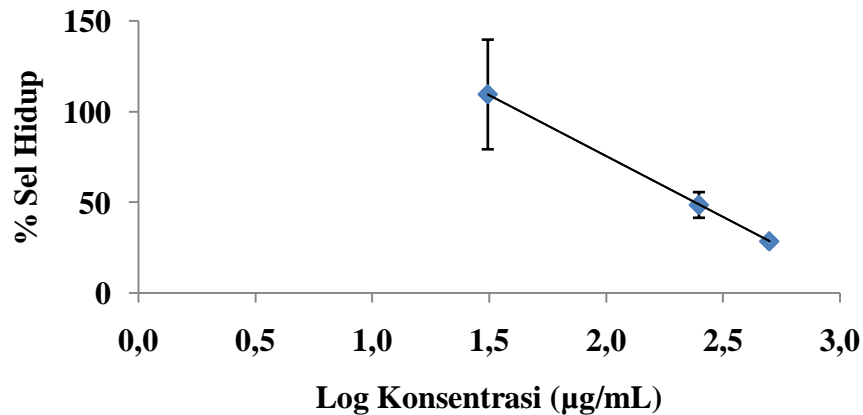
**Gambar 8.** Grafik log konsentrasi vs % sel hidup fraksi polar herba kitolod**Tabel 5.** Data % sel hidup fraksi semipolar herba kitolod

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Absorbansi 1	Absorbansi 2	Abs Rata-rata	% sel hidup rata-rata	SD (n=2)
62,5	1,796	0,401	0,401	0,401	99,054	0,000
125	2,097	0,376	0,372	0,374	86,278	1,338
250	2,398	0,325	0,335	0,330	65,457	3,346

**Gambar 9.** Grafik log konsentrasi vs % sel hidup fraksi semipolar herba kitolod

Tabel 6. Data % sel hidup fraksi nonpolar herba kitolod

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Absorbansi 3	Absorbansi 4	Abs Rata-rata	% sel hidup rata-rata	SD (n=2)
31,25	1,495	0,313	0,266	0,290	109,545	30,213
250	2,398	0,217	0,228	0,223	48,636	7,071
500	2,699	0,201	0,200	0,201	28,636	0,643

**Gambar 10.** Grafik log konsentrasi vs % sel hidup fraksi nonpolar herba kitolod

Perhitungan nilai IC_{50} diperoleh dari plot kurva baku log konsentrasi vs % sel hidup (Suhendi *et al.*, 2014) dari masing-masing sampel yang diuji dengan diambil 3 titik konsentrasi. Hasil pengolahan data dari ekstrak etanol dan fraksi polar dengan menggunakan 3 titik konsentrasi, yaitu pada seri konsentrasi 62,5; 125; dan 500 µg/mL. Fraksi semipolar pada seri konsentrasi 62,5; 125; dan 250 µg/mL, sedangkan pada fraksi nonpolar, digunakan 3 titik pada seri konsentrasi 31,25; 250, dan 500 µg/mL. Pada grafik di atas menunjukkan banyaknya % sel hidup tergantung dengan dosis dari senyawa yang diberikan (fenomena *dose dependent*). Semakin tinggi konsentrasi (dosis) senyawa, maka jumlah sel kanker yang hidup semakin sedikit. Kurva baku yang diperoleh dari masing-masing data yang diuji yaitu $Y = -38,50x + 154,6$ dengan linearitas 0,998 pada ekstrak etanol (Gambar 7), $Y = -32,16x + 124,9$ dengan linearitas 0,978 pada fraksi polar (Gambar 8), $Y = -55,80x + 200,6$ dengan linearitas 0,981 pada fraksi semipolar (Gambar 9), dan $Y = -67,25x + 210,0$ dengan linearitas 1 pada fraksi nonpolar (Gambar 10).

Tabel 7. Uji sitotoksik pada ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar herba kitolod

Sampel yang diuji	Nilai IC_{50}	Keterangan
Ekstrak etanol	521,054 µg/mL	Memiliki aktivitas sitotoksik moderat
Fraksi polar	213,294 µg/mL	
Fraksi semipolar	499,947 µg/mL	
Fraksi nonpolar	239,431 µg/mL	

Suatu senyawa dikategorikan ke dalam senyawa sitotoksik yang poten apabila memiliki nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, memiliki aktivitas sitotoksik moderat apabila nilai IC_{50} pada rentang 100-1000 $\mu\text{g/mL}$, dan tidak memiliki aktivitas sitotoksik apabila nilai $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (Prayong *et al.*, 2008). Hasil uji sitotoksik yang terdapat pada Tabel 7 tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar memiliki aktivitas sitotoksik moderat pada sel MCF-7.

Pada penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, ekstrak etanol herba kitolod memiliki aktivitas sitotoksik dengan kekuatan moderat pada sel HeLa dengan nilai IC_{50} sebesar 227 $\mu\text{g/mL}$ (Hapsari *et al.*, 2016), sedangkan pada fraksi etil asetat daun kitolod juga memiliki aktivitas sitotoksik moderat pada sel WiDr dengan nilai IC_{50} sebesar 191,74 $\mu\text{g/mL}$ (Magfiroh, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa sensitifitas penghambatan pertumbuhan dari tiap sel kanker berbeda-beda. Ekstrak etanol herba kitolod pada sel heLa dan MCF-7 memiliki perbedaan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Suatu senyawa yang memiliki aktivitas sitotoksik kategori moderat dapat dimanfaatkan sebagai agen kemoprevensi, yang mampu mencegah dan menghambat pertumbuhan dari sel kanker (Prayong *et al.*, 2008).

Senyawa yang diperkirakan memiliki aktivitas sitotoksik pada ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar yaitu flavonoid. Senyawa flavonoid, memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker dengan mekanisme menurunkan enzim xantin oksidase, siklooksigenase (COX), dan lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam proses oksidasi sehingga akan menunda siklus sel (Ren *et al.*, 2003). Selain itu, senyawa flavonoid juga memiliki kemampuan untuk menghambat *p-glycoprotein*, sehingga dapat melawan kerja dari MDR atau *multi-drug resistance* pada pengobatan kemoterapi (Bansal *et al.*, 2009).

Nilai IC_{50} pada ekstrak etanol lebih besar daripada fraksi polar dan nonpolarnya, sehingga aktivitas sitotoksiknya juga lebih lemah dibandingkan fraksi polar dan nonpolar. Hal ini diperkirakan karena pada ekstrak etanol, kandungan senyawanya masih kompleks dan beragam, baik senyawa yang bersifat polar, semipolar, dan polar, sehingga efek sitotoksiknya akan saling mempengaruhi pada sel kanker (Ismiyati *et al.*, 2015; Djajanegara and Wahyudi, 2009).

4. PENUTUP

Ekstrak etanol, fraksi polar, semipolar, dan nonpolar herba kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) memiliki aktivitas sitotoksik dengan kemampuan moderat pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut yaitu 521,054; 213,294; 499,947; dan 239,431 $\mu\text{g/mL}$. Kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol herba kitolod (*Isotoma longiflora* (L.) C. Presl.) yaitu flavonoid, fenolik, alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, dan tanin.

PERSANTUNAN

Ucapan terima kasih kepada seluruh dosen, laboran, karyawan, staf Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, dan seluruh pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaliah, A. R., 2014, *Pengaruh Infus Daun Kitolod (Laurentia longiflora) Terhadap Histopatologi Mata Tikus Wistar Katarak yang Diinduksi Methyl Nitroso Urea.*, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.
- American Cancer Society, 2015, Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016, *Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016*.
- American Cancer Society, 2016, Cancer Facts & Figures 2016, *Cancer Facts & Figures 2016*, 1–9.
- Anderson, B. O., 2014, *Breast Cancer*, Cancer Research UK. England and Wales, Scotland and the Isle of Man.
- Bansal T., Jaggi M., Khar R.K. and Talegaonkar S., 2009, Emerging significance of flavonoids as P-glycoprotein inhibitors in cancer chemotherapy, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 12 (1), 46–78.
- BPOM RI, 2010, *Acuan Sediaan Herbal*, 1st ed., Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Djajanegara I. and Wahyudi P., 2009, Pemakaian sel HeLa dalam uji sitotoksitas fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *Annona squamosa*, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 7 (1), 7–11.
- Hapsari A., Asti D., Hidayati R., Kumalla N. and Suhendi A., 2016, The Potency of Kitolod (*Isotoma longiflora* (L) Presl.) Herb Extract as a Cure for Cervical Cancer: an in Vitro Study of Hela Cells, (L), 109–114.
- Harborne J.B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerbit ITB, Bandung.
- Hariana A., 2008, *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Cetakan ke-5, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Haryoto, Irjayanti A.N., Suhendi A., Muhtadi and Sujono T.A., 2015, Cytotoxic Activity of Polar, Semipolar, and Nonpolar Fraction of Ethanol Extract of Sala Plants Leaves (*Cynometra ramiflora* Linn.) Against WiDr Cell, Dalam *ICB Pharma II "Current Breakthrough in Pharmacy Materials and Analyses"*, Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Surakarta Surakarta, Central Java, Indonesia, pp. 60–64.
- Ismailova M., 2008, *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Daun Kitolod (Laurentia longiflora (L.)Peterm.) Terhadap Bakteri yang Diisolasi dari Pasien Penderita Konjungtivitis.*, Institut Teknologi Bandung.
- Ismiyati N., Mardiyarningsing A. and Trilestari, 2015, Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Eetanolik dan fraksi dari Ekstrak Etanolik Daun Pandan (*Pandanus amaryllifolius* ROXB) Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7, *The 2nd University Research Coloquium 2015*, 343–348.
- Kementerian Kesehatan RI, 2015, Stop Kanker, *Infodatin Kanker*, Jakarta.
- Koller E., 2009, *Javanese Medicinal Plants used in Rural Communities.*, Wien University.
- Kurnijasanti R., Hamid I.S. and Rahmawati K., 2008, Efek sitotoksik in vitro dari ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap kultur sel kanker mieloma, *J. Penelit. Med. Eksakta*, 7 (1), 48–54.

- Magfiroh L., 2015, *Uji Sitotoksitas Fraksi-Fraksi Hasil Pemisahan Crude Extract Daun Kitolod (Isotoma longiflora L.) Terhadap Cell Line Kanker Kolon WiDr.*, Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga.
- Marliana S.D., Suryanti V. and Suyono, 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, 3 (1), 26–31.
- Maulida R. and Guntarti A., 2015, Pengaruh UkuranPsrtikel Beras Hitam (*Oryza Sativa* L.) Terhadap Rendemen Ekstrak dan Kandungan Total Antosianin, *Pharmaciana*, 5, 9–16.
- McMurry and Fay, 2004, *Chemistry*, 4th Edition., Pearson Education International., Belmont.
- Prayong P., Barusrux S. and Weerapreeyakul N., 2008, Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants, *Fitoterapia*, 79 (7-8), 598–601.
- Purwaningsih E., Widayanti E. and Suciati Y., 2014, Cytotoxicity assay of *Typhonium flagelliforme* Lodd against breast and cervical cancer cells, 33 (2), 75–82.
- Putri H., 2013, *Protokol Uji Sitotoksik Metode MTT*, CCRC, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L. and Zhang L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Reviews*, 23 (4).
- Rothan H.A., Zulqarnain M., Ammar Y.A., Tan E.C., Rahman N.A. and Yusof R., 2014, Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay, *Tropical Biomedicine*, 31 (2), 286–296.
- Safitri I., Yulis I.M. and Dasni H., 2009, Isolasi dan Uji Aktifitas Antimikroba Ekstrak Metanol Bunga, Batang dan Daun Sapu Jagad (*Isotoma Longiflora* (L) Presl.) terhadap Staphylococcus Aureus, *Jik*, 3 (1), 20–23.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*, Deepublish, Sleman.
- Setyowati W.A.E., Ariani S.R.D., Ashadi, Mulyani B. and Rahmawati C.P., 2014, Skrining Fitokimia Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Metanol Kulit Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Varietas Petruk, *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI*, 271–280.
- Siregar R.M., 2015, Antibacterial Activity of Kitolod (*Laurentia longiflora* (L). Peterm) Leaf and Flower Extact Against Several Conjunctivity Causing Bacteria, *Bogor Agricultural University*, 1 (L), 8.
- Suhendi A., Muhtadi, Leonita Adhiyati H, Sudjono T.A. and Haryoto, 2014, Aktivitas Sitotoksik dari Ekstrak Kulit Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.), dan Kelengkeng (*Dimocarpus longan* Mark.) terhadap Sel Vero dan HeLa, 59–63.
- Wardani T. and Siska H., 2010, Uji Efek Antiglaukoma Infus Daun Kitolod (*Isotoma longiflora* (L) C. Presl) Terhadap Tikus Putih Jantan Berdasarkan Tekanan Bola Mata, *Ejournal.Uhamka.Ac.Id*, (L), 5.